

اصلاح شیمیایی زایلان استخراج شده از مغز باگاس به منظور تهیه فیلم ضد باکتریایی کیتوسان/کربوکسی متیل زایلان

پردیس یوسفی^۱، سپیده حامدی^{۲*}، اسماعیل رسولی گرمارودی^۳ و مجتبی کوشا^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، پردیس علمی تحقیقاتی زیراب، دانشگاه شهید بهشتی، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، پردیس علمی تحقیقاتی زیراب، دانشگاه شهید بهشتی، ایران
پست الکترونیک: se_hamedi@sbu.ac.ir

۳- استادیار، عضو هیئت علمی، گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، پردیس علمی تحقیقاتی زیراب، دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

پالایش زیستی شامل فناوری‌هایی است که قادر به تبدیل منابع زیست‌توده به محصولات با ارزش افزوده بالاتر می‌باشند. در این تحقیق، ابتدا همی سلولزهای غنی از زایلان از مغز باگاس نیشکر استخراج شده و بعد تحت فرایند کربوکسی متیلاسیون قرار گرفتند. درجه استخلاف زایلان کربوکسی متیل‌دار شده توسط دستگاه (ICP-OES)، ۰/۶۸ گزارش شد. ظهور باندهای جذب در 1580 cm^{-1} و 1311 در طیف FTIR همی سلولز اصلاح شده، مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-O گروه‌های کربوکسی متیل است. فیلم‌های زایلان کربوکسی متیل‌دار شده/کیتوسان با روش قالب‌ریزی و تبخیر حلال تهیه شدند. کاهش شدت پیک مشخصه کیتوسان پس از اختلاط با همی سلولز کربوکسیله شده در طیف XRD نشان داد که بلورینگی آن کاهش یافته است. آنالیز SEM نشان داد که سطح فیلم یکنواخت است. پیک آگروترمیک دیده شده در نمودارهای حاصل از آنالیز DSC نشان داد که تخریب فیلم‌ها در دمای بیشتر از 200 درجه سلسیوس رخ می‌دهد. نتایج آزمون نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخار آب نشان داد که نفوذپذیری فیلم همی سلولز کربوکسی متیل‌دار شده/کیتوسان $0.1 \pm 0.084 \text{ [g. mm}^2 \text{ h kPa]}$ می‌باشد. نتایج رنگ‌سنجی نشان داد که شاخص‌های سفیدی و زردی در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با زایلان/کیتوسان به ترتیب افزایش و کاهش یافته است. تورم فیلم‌های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان به ترتیب $95/71$ و $130/42$ گزارش شد. فیلم کربوکسی متیل همی سلولز/کیتوسان نسبت به همی سلولز/کیتوسان دارای استحکام بیشتری است که ناشی از ایجاد اتصال بین گروه‌های آمین کیتوسان و گروه‌های کربوکسیل همی سلولز می‌باشد. خاصیت ضدباکتریایی فیلم تهیه شده در برابر باکتری/شریشیاکلی در مقایسه با باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس قوی‌تر است.

واژه‌های کلیدی: مغز باگاس، استخراج قلیایی زایلان، کربوکسی متیل زایلان، فیلم زایلان/کیتوسان، فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان، فعالیت ضدباکتریایی

مقدمه

هستند. بر این اساس توجه بسیاری از محققان به استفاده از زیست‌توده به‌عنوان منبع اولیه به‌منظور کاربرد در صنایع مختلف به‌ویژه صنایع غذایی و دارویی معطوف شده است (Anthon, et al., 2015). همی سلولزها یکی از سه مولکول

رویکرد نوین پالایش زیستی شامل فناوری‌هایی است که قادر به تبدیل منابع زیست‌توده به محصولات با ارزش افزوده بالاتر مانند مواد شیمیایی زیست‌پایه و حامل‌های انرژی تبدیل

تحقیق، استخراج زایلان مغز باگاس و استفاده از آن در تهیه فیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مغز باگاس به‌عنوان منبع زایلان از شرکت کاغذسازی پارس در هفت‌تپه خوزستان تهیه شد. اتانول ۹۹٪ از شرکت تقطیر خراسان، متانول ۹۹٪ از شرکت آروین شیمی، ایزوپرپانول از شرکت دکتر مجللی، پتاسیم هیدروکسید از شرکت لوبامی، سدیم هیدروکسید و سدیم مونوکلرو استات از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. محیط‌های کشت جامد و مایع نوترینت آگار و نوترینت براث نیز از شرکت سیگما-آلدریج تهیه گردید.

استخراج زایلان به روش تیمار قلبایی: نمونه‌های مغز باگاس نیشکر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک و به‌وسیله آسیاب خانگی و مطابق با استاندارد TAPPI آیین‌نامه شماره T257cm-02 به پودر تبدیل شدند. سپس به کمک دستگاه غربال لرزشی آزمایشگاهی غربال شد. پودر مغز باگاس (برمبنای وزن خشک) پس از اختلاط با محلول سدیم هیدروکسید (با نسبت ۸٪ وزنی / وزنی) به مدت ۵ دقیقه در مخزن پخت در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس پیش‌تیمار شد (Shafiei, 2018). سپس خمیر حاصل با ۳/۰ گرم سدیم کلریت و ۱/۰ میلی‌لیتر اسید استیک (به ازای یک گرم وزن خشک خمیر) رنگبری گردید (Ahlgren and Goring, 1971). خمیر رنگبری شده با پتاسیم هیدروکسید ۱۰٪ (با نسبت جامد به مایع ۲۰:۱) مخلوط و توسط همزن با سرعت ۲۵۰rpm به مدت ۱ ساعت هم زده شد و بعد به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. مخلوط حاصل در معرض فیلتراسیون خلأ قرار گرفته و جزء صاف شده غنی از همی سلولز پس از خنثی‌سازی با اسید استیک (تا رسیدن به pH ۴/۵) با محلول اتانول ۹۵٪ (معادل سه برابر حجم صاف شده) به‌منظور ایجاد رسوب مخلوط و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس مخلوط حاصل دوباره از صافی عبور

ساختاری همراه با سلولز و لیگنین در ترکیبات سازنده زیست‌توده هستند که به‌طور گسترده در پسماندهای کشاورزی لیگنوسلولزی یافت می‌شوند. همی سلولزها ساختارهای ناهمگن متشکل از قندهای هگروز و پنتوز می‌باشند (Guan et al., 2014). در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات همی سلولزی به دلیل قابلیت‌های بالقوه آن در تشکیل فیلم، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، سهولت دسترس‌پذیری ضایعات کشاورزی و صرفه اقتصادی بسیار مورد استقبال قرار گرفته است (Guan et al., 2014). همی سلولزها طبیعت آب دوست دارند و فیلم‌های بر پایه همی سلولز دارای خواص نیمه بلورین بوده، جاذب رطوبت هستند و از استحکام مکانیکی ضعیفی برخوردارند. کاربرد عملی فیلم‌های همی سلولزی به دلیل معایب ذکرشده به شدت محدود شده است (Chen et al., 2016). اصلاح شیمیایی پلی‌ساکاریدها، رایج‌ترین روش برای تغییر خواص آنها به‌منظور استفاده از این منابع تجدیدپذیر در مفهوم توسعه پایدار به‌شمار می‌رود. همی سلولزها دارای گروه‌های هیدروکسیل بی‌شماری هستند که در طول زنجیره اصلی و زنجیره‌های جانبی توزیع شده‌اند. این گروه‌های هیدروکسیل می‌توانند پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی زیادی را تشکیل دهند (Chen et al., 2016). گروه‌های هیدروکسیل به‌طور بالقوه قابلیت فرایندهایی مانند استری شدن، اتری شدن، اکسیداسیون و واکنش‌های دیگر مانند هیدرولیز و احیاء را دارند. مشتقات همی سلولزی کربوکسی‌متیل‌دار شده برای افزایش حلالیت در آب مرسوم هستند (Sukhbaatar et al., 2014). در میان این مشتقات عامل‌دار شده، کربوکسی‌متیل همی سلولزها که سبب بروز عملکرد آنیونی پلیمر می‌شوند، به‌طور گسترده‌ای در صنایع نساجی، کاغذسازی، حذف فلزات سنگین و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Peng et al., 2011). تحقیقات پیشین نشان داده که مغز باگاس موجود در تفاله باقی‌مانده از کارخانه‌های تولید نیشکر در ایران سرشار از همی سلولز است (Shafiei, 2018). با توجه به اینکه میزان ضایعات حاصل از کارخانه‌های تولید نیشکر در ایران قابل توجه است و در حال حاضر نیز استفاده بهینه‌ای از این تفاله نمی‌شود، هدف این

$$DS = \frac{132 \times \%Na}{2300 - 80 \times \%Na} \quad \text{رابطه ۱}$$

کروماتوگرافی ژل تراوایی (GPC): توزیع وزن مولکولی

و میانگین وزن مولکولی زایلان استخراج شده با استفاده از دستگاه GPC (مدل USA Shimadzu LC-20A) مجهز به آشکارساز ضریب شکست (RT) اندازه‌گیری شد. شرایط عملیاتی دستگاه شامل فاز متحرک نیترات سدیم، ۰/۱ مولار، سرعت جریان تزریق ۱ ml/min و دمای ستون ۳۵ °C بود. برای آماده‌سازی نمونه برای تزریق به دستگاه، ۱۰۰ mg زایلان در ۱۰ cc آب حل شد.

تهیه فیلم‌های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل

زایلان/کیتوسان: ابتدا محلول‌های آبی ۱٪ زایلان و کربوکسی متیل زایلان تهیه شدند. محلول ۱٪ کیتوسان نیز در استیک اسید ۱٪ تهیه شد. برای تهیه فیلم‌های زایلان/کیتوسان، محلول‌های کیتوسان و زایلان با نسبت جرمی برابر مخلوط شده و به مدت یک شبانه‌روز روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. فیلم‌های کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نیز از اختلاط محلول‌های کربوکسی متیل زایلان و کیتوسان با نسبت‌های جرمی برابر تهیه شدند. محلول‌های تهیه شده در معرض فرا آواهی^۱ به مدت ۲۰ ثانیه با شدت ۲۰ آمپلی تود قرار گرفته و در نهایت فیلم‌ها به روش قالب‌ریزی و تبخیر حلال (casting) تهیه و در مجاورت هوای آزاد خشک شدند (Zhu Ryberg *et al.*, 2011).

آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR):

برای شناسایی گروه‌های عاملی درگیر و پایش کربوکسی متیلاسیون زایلان از طیف‌سنج تبدیل فوریه قرمز (مدل پرکین-المر آلمان) با محدوده طیف روبشی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ و با دقت 4 cm^{-1} استفاده شد.

داده شد و جزء جامد باقی‌مانده روی کاغذ صافی به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خشک شد و به‌عنوان منبع غنی از زایلان مورد استفاده قرار گرفت (Ren *et al.*, 2008).

کربوکسی متیل دار کردن زایلان: ابتدا حدود ۲ گرم

پودر زایلان (برابر ۱۵ میلی‌مول) در ۱۶/۴ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۲۵ w/v٪ (برابر ۶۱/۵ میلی‌مول) کاملاً حل شد. سپس به آن ۲۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول اضافه شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه به شدت هم زده شد. حدود ۳/۵ گرم سدیم مونوکلرواستات (برابر ۳۰ میلی‌مول که در ۱۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول حل شده)، قطره‌قطره به محلول فوق اضافه شد و دوغاب حاصل به مدت ۷۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس با سرعت زیاد به شدت هم زده شد. بعد از به پایان رسیدن فرایند و خنک شدن سوسپانسیون، خنثی‌سازی با استیک اسید ۵۰٪ انجام گردید. جزء جامد حاصل از عملیات فیلتراسیون (کربوکسی متیل زایلان) چندین بار با متانول ۸۰٪ و در نهایت با متانول خالص شستشو داده شد و به مدت ۲ روز در هوای آزاد خشک شد (Šimkovic *et al.*, 2014).

تعیین درجه استخلاف: میزان یون سدیم موجود در

نمونه کربوکسی متیل دار شده با استفاده از طیف‌سنجی پلاسما جفت‌شده القایی-اسپکترومتري نوری (ICP-OES) مدل (Varian-Inc, USA, VISTA-PRO model) مشخص شد. ابتدا هضم اسیدی نمونه (حدود ۰/۱ گرم) توسط اسید نیتریک تحت تابش میکروویو انجام شد و پس از اندازه‌گیری میزان یون سدیم توسط دستگاه، درجه استخلاف از طریق رابطه ۱ محاسبه شد (Hettrich *et al.*, 2017).

سدیم (رطوبت نسبی ۷۰٪) قرار گرفتند. به مدت یک هفته هرچند ساعت یکبار، ظروف شیشه‌ای توزین شدند. مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها، از روی افزایش وزن ظروف شیشه‌ای تعیین گردید. نمودار افزایش وزن ظروف شیشه‌ای به صورت تابعی از زمان رسم شد و نفوذپذیری میزان بخار بعد از محاسبه شیب خط بوسیله رابطه ۲ محاسبه گردید. در رابطه زیر $WVTR$ از تقسیم شیب خط بر سطح مقطع فیلم در معرض بخار آب حاصل شد. R_1 و R_2 به ترتیب نشان‌دهنده رطوبت‌های نسبی درون دسیکاتور و ظروف هستند. P فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بر حسب کیلوپاسکال است.

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \quad \text{رابطه ۲}$$

آنالیز رنگ‌سنجی: فیلم‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان رنگ با استفاده از پارامترهای هانتر برحسب روشنایی (L^*)، سرخی - سبزی (a^*) و زردی-آبی (b^*) بیان شد (Koosha and Hamed, 2019). ابتدا دستگاه با صفحات استاندارد سفید و سیاه کالیبره شد. نتایج اختلاف رنگ نهایی (ΔE)، شاخص زردی (YI) و شاخص سفیدی (WI) به صورت میانگین حاصل از پنج اندازه‌گیری از نقاط مختلف فیلم‌ها (یک نقطه مرکزی و چهار نقطه پیرامونی) گزارش شدند.

درجه تورم: قطعاتی از فیلم‌ها در ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ برش داده شدند و بعد از ثبت وزن اولیه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور گردیدند (Akhgari et al., 2010). نمونه‌ها پس از خروج و حذف آب اضافی دوباره توزین شده و درجه تورم آنها بوسیله رابطه زیر حاصل شد.

$$\text{درجه تورم} = \frac{\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}} \quad \text{رابطه ۳}$$

آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD): برای شناسایی ترکیب فازی نمونه‌های تهیه شده از روش پراش پرتوایکس استفاده شد. الگوهای ساختاری زیلان و فیلم‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه XRD (مدل فیلیپس پی دبلو-۱۷۳، هلند) حاصل شدند. این دستگاه مجهز به لامپ مس (Cu) در طول موج 1.5406 \AA آنگستروم، جریان ۳۰ میلی‌آمپر و ولتاژ ۴۰ کیلوولت عمل می‌کند. الگوهای پراش نمونه‌ها در محدوده زاویه $2\theta = 5 - 60$ ثبت شدند.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی - طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (SEM-EDX): مورفولوژی فیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل اس‌یو، هیتاچی، ژاپن) با بزرگنمایی $30 \mu\text{m}$ و با ولتاژ ۱۵ Kv مورد بررسی قرار گرفت. برای آماده‌سازی، نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا پوشانده شدند.

آنالیز گرماسنجی روبشی دیفرانسیلی (DSC): آنالیز حرارتی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کالریتری DSC (مدل Testonix، شرکت صنایع آریا، ایران) انجام شد. نمونه‌ها از دمای اتاق تا دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس با میزان حرارت‌دهی ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه گرمادهی شده و آنتالپی به‌طور پیوسته اندازه‌گیری شد. تمام آزمون‌ها تحت جو نیتروژن با میزان جریان ۳۶ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام گردید.

اندازه‌گیری نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP): برای اندازه‌گیری سرعت انتقال بخار آب فیلم‌ها از استاندارد ASTM E9 استفاده شد. برای انجام این کار، از ظروف شیشه‌ای کوچک با قطر دهانه ۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۴/۵ سانتی‌متر استفاده شد. ابتدا ۱۰ گرم سیلیکاژل به‌منظور ایجاد رطوبت نسبی برابر صفر درون ظروف قرار گرفت. سپس، قطعه‌ای از فیلم‌های تهیه شده به‌عنوان درپوش ظروف روی آنها ثابت شدند. ظروف شیشه‌ای همراه با محتویات آنها پس از توزین، درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع شده کلرید

شمارش تعداد کلونی ظاهر شده روی هر پلیت و در نظر گرفتن عدد رقت محاسبه شد. قابلیت ضدباکتریایی فیلم‌ها بر اساس کاهش جمعیت باکتریایی در حضور فیلم‌ها در مقایسه با جمعیت باکتریایی کنترل و از رابطه ۴ محاسبه شد. آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شده و فالكون‌های حاوی محیط کشت و مایه تلقیح شده (بدون حضور فیلم) نیز به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

$$E (\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100 \quad \text{رابطه ۴}$$

پارامترهای A و B در رابطه بالا به ترتیب نشان‌دهنده تعداد کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت کنترل و محیط کشت حاوی فیلم‌های تهیه شده می‌باشند.

نتایج

نتایج درجه استخلاف و GPC: با استفاده از آنالیز آزمایشگاهی ICP مقدار یون سدیم موجود در کربوکسی متیل زایلان، ۹۳۰۰۰ ppm گزارش شد. با استفاده از رابطه تعیین درجه استخلاف، DS به‌دست‌آمده ۰/۶۸ می‌باشد. میانگین وزن مولکولی (Mw) زایلان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوایی ۷۶۰ کیلو دالتون محاسبه شد (Veisi et al., 2018).

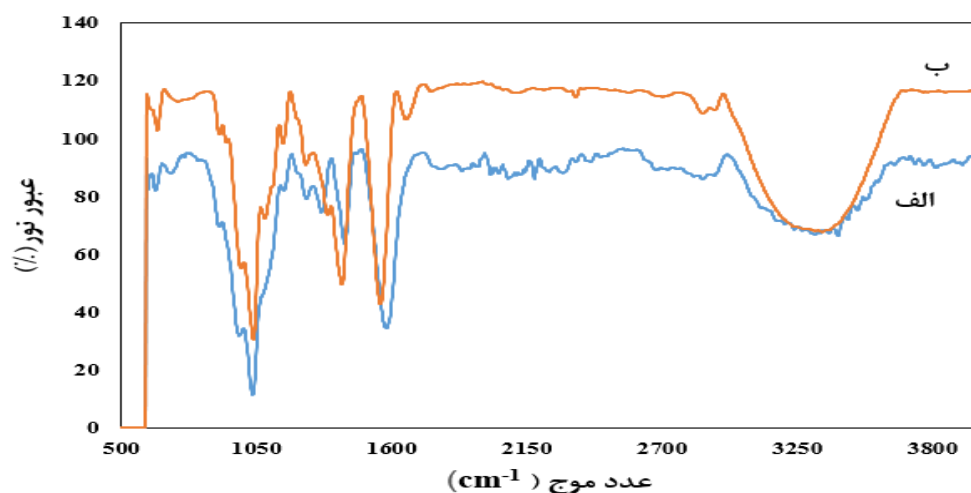
نتایج FTIR: طیف‌های حاصل از FTIR نمونه‌های زایلان

و زایلان کربوکسی متیل‌دار شده در شکل ۱ ارائه شده است.

خواص مکانیکی: استحکام کششی (TS) و درصد کشیدگی در نقطه شکست (E%) فیلم‌ها طبق استاندارد (ASTM D882) با استفاده از دستگاه رتومتر (مدل ۱۷۰۲-Z، شرکت شیباکو، ژاپن) اندازه‌گیری شد.

فعالیت ضد باکتریایی: برای تعیین قابلیت ضدباکتریایی

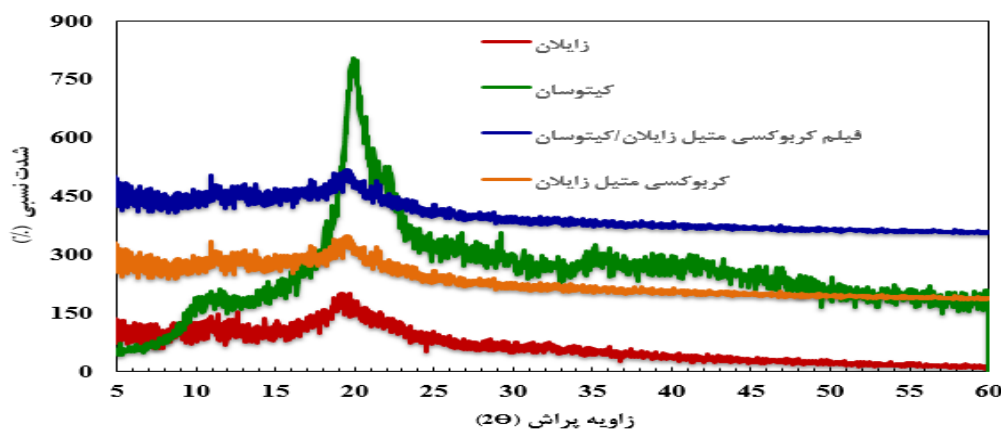
فیلم‌های تهیه شده از باکتری‌های /شریشیاکلی (گرم منفی) و /استافیلوکوکوس/اورئوس (گرم مثبت) استفاده شد. به‌منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی، یک لوپ کامل از کلونی‌های رشد کرده روی بشقابک حاوی محیط کشت جامد به ارلن حاوی محیط کشت مایع سترون نوترینت برات تلقیح شده و به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ °C و دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. سپس فیلم‌ها به قطعات ۱×۱ cm² بریده شده و پس از سترون شدن (مجاورت با اشعه ماوراءبنفش به مدت ۴۰ دقیقه) در فالكون‌های حاوی ۱۵ ml محیط کشت مایع سترون غوطه‌ور شدند. مایه تلقیح باکتریایی پس از تنظیم در کدورت برابر ۰/۵ مک فارلند به فالكون‌ها اضافه شد (حدود ۵ درصد حجمی نسبت به حجم محیط کشت مایع). در پایان همه فالكون‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ °C و دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع از هر فالكون خارج شده و به‌صورت سریالی تا رقت ۱۰^۷ رقیق‌سازی شد. حدود ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱۰^۵، ۱۰^۶ و ۱۰^۷ از هر فالكون روی بشقابک‌های نوترینت آگار به‌صورت یکنواخت کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرماگذاری گردیدند. تعداد واحدهای کلونی (CFU) از طریق



شکل ۱- نمودارهای FTIR: الف) زایلان، ب) کربوکسی متیل زایلان

صفحات بلورین (۰۲۰) و (۱۱۰) مشاهده شد (Huang *et al.*, 2017). همان گونه که در شکل ۳ مشخص است، پیک‌های مشخصه کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان به دلیل نزدیکی زوایای پراش ($\sim 20^\circ$) با یکدیگر همپوشانی دارند.

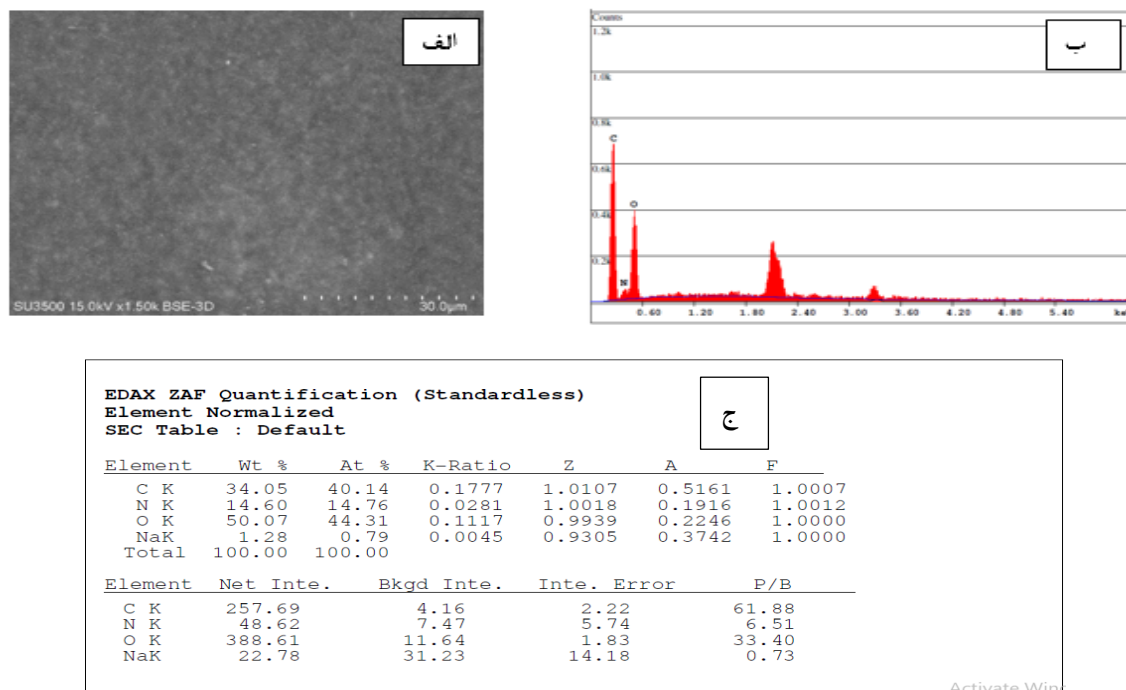
نتایج XRD: شکل ۲، طیف‌های پراش اشعه ایکس زایلان، کربوکسی متیل زایلان، کیتوسان و فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان را نشان می‌دهد. طیف زایلان در $2\theta = 19/4^\circ$ دارای پیک مشخصه پهنی است که پس از عامل‌دار شدن پهن‌تر می‌شود. برای طیف پراش کیتوسان پیک‌های مشخصه در زوایای پراش $10/4^\circ$ ، $19/9^\circ$ و $21/2^\circ$ به ترتیب مطابق با



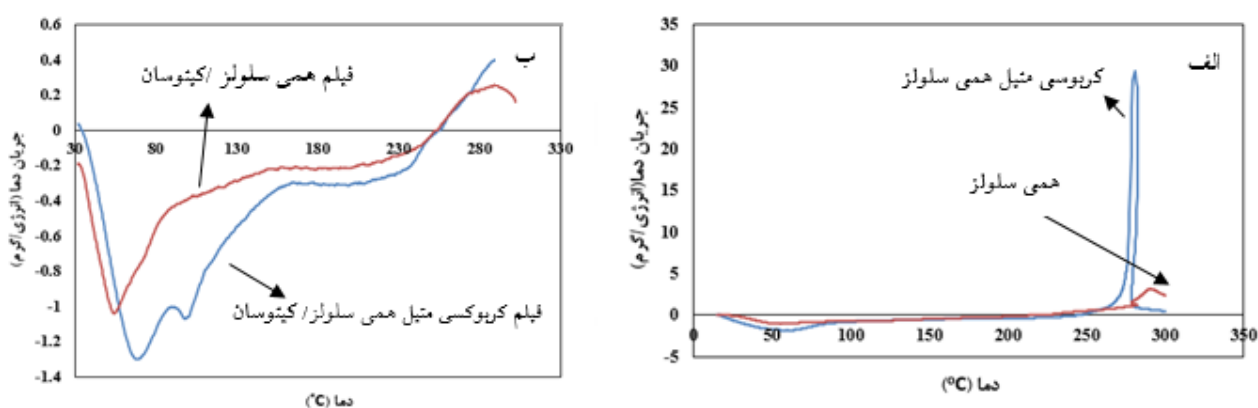
شکل ۲- طیف‌های XRD زایلان، کربوکسی متیل زایلان، کیتوسان و فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان

می‌باشد که نشان‌دهنده اختلاط همگن پلیمرهاست. طیف EDX فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۳-ب نشان داده شده است.

نتایج SEM/EDX: تصویر سطح فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۳-الف نشان داده شده است. همان گونه که در تصویر مشخص است سطح فیلم یکنواخت



شکل ۳- الف) تصویر فیلم کربوکسی متیل همی سلولز / کیتوسان، ب) تصویر EDAX فیلم کربوکسی متیل همی سلولز / کیتوسان



شکل ۴- نمودارهای DSC: الف) همی سلولز، کربوکسی متیل همی سلولز، ب) فیلم همی سلولز / کیتوسان، فیلم کربوکسی متیل

همی سلولز / کیتوسان

زایلان / کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان / کیتوسان اندکی کاهش یافته است.

نتایج WVP: نتایج نفوذپذیری فیلم‌های تهیه شده در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول ۱، نفوذپذیری فیلم کربوکسی متیل زایلان / کیتوسان در مقایسه با فیلم

نتایج DSC: با توجه به شکل ۴-الف، تجزیه حرارتی زایلان و کربوکسی متیل زایلان به ترتیب در دمای ۲۹۵ و ۲۸۰ درجه سلسیوس رخ داده است. همان‌طور که در شکل ۴-ب مشخص است، هرچند تخریب فیلم زایلان / کیتوسان در دمای بالاتری رخ می‌دهد، اما دمای تخریب دو فیلم به هم نزدیک می‌باشد. بنابراین مقاومت حرارتی فیلم کربوکسی متیل

زایلان/کیتوسان افزایش چشمگیری یافته است.

جدول ۱- نفوذپذیری فیلم‌های زایلان/کیتوسان و زایلان کربوکسی متیل دار شده/کیتوسان

فیلم	نفوذپذیری بخار آب [g. mm/m ² h kPa]
زایلان/کیتوسان	۰/۶۲ ± ۰/۰۵
کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان	۰/۸۴ ± ۰/۱

به فیلم زایلان/کیتوسان کاهش یافته است. از سویی شاخص سفیدی (WI) در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان افزایش یافته است.

نتایج رنگ‌سنجی: پارامترهای رنگ‌سنجی فیلم‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. شاخص روشنایی (L*) بیانگر شفافیت است. پارامترهای b* و YI که نشانگر شدت زردی فیلم می‌باشند در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نسبت

جدول ۲- پارامترهای رنگ‌سنجی فیلم‌های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان

فیلم	L*	a*	b*	ΔE*	YI	WI
زایلان/کیتوسان	۶۵/۸۸ ± ۰/۴۴	۰/۲۶۴ ± ۰/۴۷	۱۳/۱۶۶ ± ۱/۱۵	۴۳۱/۸ ± ۰/۸۵	۳۰/۹۴۶ ± ۲/۰۴	۵۸/۰۷ ± ۰/۳۶
کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان	۶۵/۶۱ ± ۲/۸۶	۰/۴۱۸ ± ۰/۴۶	۵/۸۶ ± ۰/۵۳	۴۳۵/۰۳ ± ۰/۱۱	۱۵/۷۹۲ ± ۰/۵	۵۸/۶۳ ± ۰/۲۸

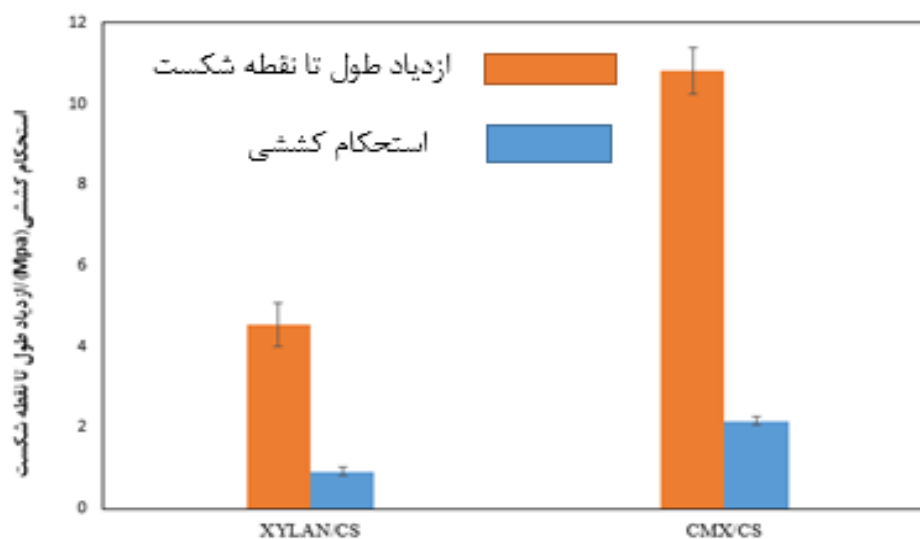
نسبت به فیلم زایلان/کیتوسان افزایش یافته است.

جدول ۳- تورم فیلم‌های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان

فیلم	تورم
زایلان/کیتوسان	۹۵/۷۱
کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان	۱۳۰/۴۲

نتایج تورم: میزان تورم در فیلم‌های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که از نتایج مشخص است، میزان تورم در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان بیشتر است.

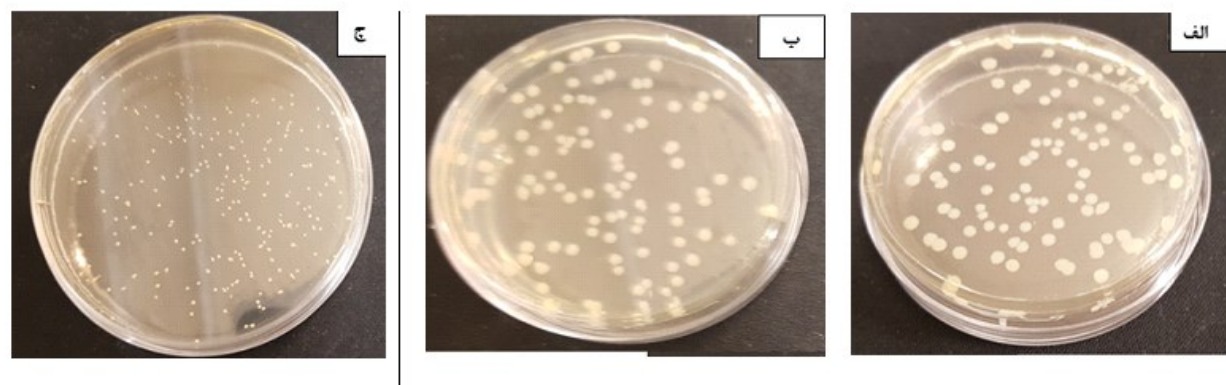
نتایج خواص مکانیکی: خواص مکانیکی (استحکام کششی و درصد کشیدگی) فیلم‌های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۵ ارائه شده است. استحکام کششی در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان



شکل ۵- استحکام فیلم‌های همی سلولز / کیتوسان و کربوکسی متیل همی سلولز / کیتوسان

فیلم سبب کاهش جمعیت هر دو گونه باکتریایی در مقایسه با جمعیت کنترل می‌شود. درصد بازدارندگی میزان رشد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* در حضور فیلم به ترتیب ۶۵٪ و ۵۷٪ محاسبه شد.

فعالیت ضد باکتریایی: میزان بازدارندگی رشد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* در حضور فیلم کربوکسی متیل زایلان / کیتوسان در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشخص است حضور



شکل ۶- شمارش تعداد کلونی‌های تشکیل شده از سوسپانسیون‌های باکتریایی: الف) *E. coli*، ب) *S. aureus* در حضور فیلم کربوکسی متیل زایلان / کیتوسان و ج) تعداد کلونی‌های ظاهر شده در محیط کنترل

بحث

حرارتی زایلان و کربوکسی متیل زایلان، فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۵ نشان داده شده است و بیانگر پیک های اندوترمیک مشاهده شده در دمای کمتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس در نمودارها ناشی از تبخیر آب سطحی و جذب شده موجود در نمونه ها می باشد. پیک های اگزوترمیک دیده شده کاهش پایداری حرارتی کربوکسی متیل زایلان در مقایسه با زایلان می تواند به کاهش درجه کریستالیت زایلان در اثر فرایند کربوکسی متیل کردن از طریق جاننشینی گروه های کربوکسیل در ساختار زایلان باشد (Casaburi et al., 2018). در نمودارها در دمای بیشتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس ناشی از تخریب پلیمر است (Saeed et al., 2014). نمودارهای حرارتی زایلان و کربوکسی متیل زایلان، فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۵ نشان داده شده است. پیک های اندوترمیک مشاهده شده در دمای کمتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس در نمودارها ناشی از تبخیر آب سطحی و جذب شده موجود در نمونه هاست. پیک های اگزوترمیک دیده شده در نمودارها در دمای بیشتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس ناشی از تخریب پلیمر است (Saeed et al., 2014). البته افزایش نفوذپذیری فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان می تواند به دلیل افزایش ویژگی آبدوستی کربوکسی متیل زایلان نسبت به زایلان باشد. در تحقیقی ابتدا کربوکسی متیل زایلان با درجه های استخلاف متفاوت (۱/۱۳-۰/۳۶) از زایلان استخراج شده از خمیر کرافت رنگبری شده توس تهیه شد و بعد نفوذپذیری فیلم های حاصل از زایلان کربوکسیله شده با درجه استخلاف متفاوت بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش درجه استخلاف کربوکسی متیل زایلان سبب افزایش نفوذپذیری فیلم ها نسبت به بخار آب شد (Lefnaoui and Moulai-Mostefa, 2015). هر دو فیلم کربوکسی متیل دار شده/کیتوسان و فیلم زایلان/کیتوسان دارای روشنایی و شفافیت یکسانی می باشند (Koosha and Hamedi, 2019). این مشاهدات می تواند به فرایند کربوکسی متیل دار کردن زایلان (تولید پودر شفاف تر

درجه استخلاف کربوکسی متیل زایلان حاصل از زایلان استخراج شده از خمیر کرافت توس در محدوده ۱/۱۳-۰/۳۶ گزارش شده است (Alekhina et al., 2014). درجه استخلاف کربوکسی متیل سلولز باگاس در محدوده ۰/۹۲-۰/۸۷ گزارش شده است (Kamthai, 2016). در تحقیقات مختلف، میانگین وزن مولکولی زایلان بامبو، برابر 9420 g/mol (Chen, Qi et al., 2016) و نیز 1340 g/mol (Guan et al., 2016) گزارش شده است. همچنین، در گزارشی دیگر میانگین وزن مولکولی زایلان باگاس $40/8 \text{ g/mol}$ (Carvalho, 2015) و نیز در محدوده $12820-23766$ گزارش گردیده است. پیک های مشاهده شده در طیف های زایلان و زایلان کربوکسی متیل دار شده در محدوده $3400-3100$ مربوط به حضور گروه های هیدروکسیل هستند (Rivas et al., 2015). همچنین حضور باندهای جذب در طول موج های $1643-1043 \text{ cm}^{-1}$ و 984 cm^{-1} در هر دو نمونه به ترتیب مربوط به گروه های C=O و C-O متعلق به گروه های بتا- گلیکوزیدی می باشند. در زایلان کربوکسی متیل دار شده، حضور باند جذب در 1640 cm^{-1} نشان دهنده حضور گروه های کربوکسیل است. این مشاهدات تأییدی بر عامل دار شدن زایلان می باشند (Queirós et al., 2017). وجود پیک پهن در زاویه $19/2$ درجه در نتایج XRD نشان دهنده خاصیت نیمه بلورین زایلان است. البته نتایج مشابهی برای ساختار زایلان ذرت گزارش شده است (Kong et al., 2016). پهن تر شدن پیک مشخصه زایلان پس از عامل دار شدن (کربوکسی متیل زایلان) تأییدی بر افزایش نواحی آمورف آن می باشد. کاهش شدت و پهنای پیک مشخصه کیتوسان پس از تشکیل فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نشان دهنده کاهش بلورینگی فیلم در مقایسه با کیتوسان می باشد. پیک های مشاهده شده در طیف EDX در نواحی $0/277 \text{ Kev}$ ، $0/525$ و $0/39$ به ترتیب حضور اتم های کربن، اکسیژن و نیتروژن را در ساختار فیلم نشان می دهد. همچنین وجود نیتروژن در طیف EDX تأییدی بر حضور کیتوسان در ساختار فیلم می باشد. نمودارهای

اشریشیاکلی در مقایسه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قوی تر است. با توجه به قطبیت سطح باکتری‌ها، غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی از لیپوبیلی ساکاریدها شامل گروه‌های فسفات و پیروفسفات تشکیل شده که سبب ایجاد بارهای منفی بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت که دیواره آنها از لایه پپتیدوگلوکان تشکیل شده، می‌شود (Kumar *et al.*, 2016).

منابع مورد استفاده

- Ahlgren, P.A. and Goring, D.A.I., 1971. "Removal of Wood Components During Chlorite Delignification of Black Spruce." *Canadian Journal of Chemistry* 49(8): 1272-1275.
- Akhgari, A., Farahmand, F., Afrasiabi Garekani, H., Sadeghi, F. and Vandamme, T., 2010. "The effect of pectin on swelling and permeability characteristics of free films containing Eudragit RL and/or RS as a coating formulation aimed for colonic drug delivery." *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 18(2): 91-96.
- Alekhina, M., Mikkonen, K.S., Alén, R., Tenkanen, M. and Sixta, H., 2014. "Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films." *Carbohydrate Polymers* 100: 89-96.
- Anthony, R., Xiang, Z. and Runge, T. 2015. Paper coating performance of hemicellulose-rich natural polymer from distiller's grains.
- Carvalho, D.M.D., 2015. "Study on the structure and properties of xylan extracted from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw".
- Casaburi, A., Montoya Rojo, Ú., Cerrutti, P., Vázquez, A. and Foresti, M.L., 2018. "Carboxymethyl cellulose with tailored degree of substitution obtained from bacterial cellulose." *Food Hydrocolloids* 75 : 147-156.
- Chang, A.K.T., Frias, R. R., Alvarez, L.V., Bigol, U.G. and Guzman, J.P.M.D., 2019. "Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17: 189-199.
- Chen, G.G., Qi, X.M., Guan, Y., Peng, F., Yao, C.L. and Sun, R.C., 2016. "High Strength Hemicellulose-Based Nanocomposite Film for Food Packaging Applications." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(4): 1985-1993.
- Chen, G.G., Qi, X.M., Guan, Y., Peng, F., Yao, C.L. (پس از کربوکسیله شدن) نسبت داده شود (Koosha and Hamed, 2019). در یک تحقیق، شاخص روشنایی فیلم حاصل از کیتوسان و PVA، در مقایسه با فیلم شاهد (PVA) به دلیل حضور کیتوسان، کاهش یافته است (Suman *et al.*, 2010).
- افزایش میزان تورم فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نسبت به فیلم زایلان/کیتوسان می‌تواند به حضور گروه‌های کربوکسی متیل در زنجیره پلیمری زایلان کربوکسی متیل دار شده که سبب افزایش ویژگی آبدوستی آن در مقایسه با زایلان و همچنین میزان جذب و نگهداری آب در فیلم می‌شود، نسبت داده شود (Li, Lin *et al.*, 2019). افزایش استحکام فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان می‌تواند به دلیل تشکیل پلی‌الکترولیت از طریق ایجاد اتصال بین گروه‌های آمین کیتوسان و گروه‌های کربوکسیل زایلان باشد. در یک تحقیق گزارش شده که مقاومت به پاره شدن و استحکام کششی در فیلم کربوکسی متیل سلولز/کیتوسان نسبت به فیلم سلولز/کیتوسان افزایش یافته است (Valizadeh *et al.*, 2019). با توجه به اینکه در منابع ذکر شده که زایلان و مشتقات آن دارای خواص ضد میکروبی نمی‌باشند، بنابراین خاصیت ضدباکتریایی فیلم از حضور کیتوسان ناشی می‌شود (Chang *et al.*, 2019). با توجه به تشکیل گروه‌های آمینی با بار مثبت (NH_3^+) پس از انحلال کیتوسان در محلول اسیدی رقیق، بروز خاصیت ضد میکروبی می‌تواند به برهم‌کنش میان این ساختار پلی کاتیونی و گروه‌های با بار منفی روی غشاء سلول‌های باکتریایی نسبت داده شود. این جاذبه الکترواستاتیک از یکسو سبب تغییر در نفوذپذیری دیواره سلولی و عدم توازن اسمزی می‌شود که در نتیجه از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند. از سوی دیگر سبب هیدرولیز پپتیدوگلوکان‌های دیواره سلولی شده که سبب نشت الکترولیت‌های داخل سلولی و ترکیبات پروتئینی می‌شود و مانع تکثیر و رشد سلولی باکتری‌ها می‌شود (Shanmugam *et al.*, 2016). نتایج تحقیق نشان می‌دهد که خاصیت ضدباکتریایی فیلم تهیه شده در برابر باکتری

- "Development of carboxymethyl xylan films with functional properties." *Journal of Food Science and Technology* 54(1): 9-17.
- Ren, J.L., Sun, R.C. and Peng, F., 2008. "Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse." *Polymer Degradation and Stability* 93(4): 786-793.
- Rivas, S., Galletti, A., Antonetti, C., Santos, V. and Carlos Parajó, J., 2015. Sustainable Production of Levulinic Acid from the Cellulosic Fraction of Pinus Pinaster Wood: Operation in Aqueous Media Under Microwave Irradiation.
- Saeed, A., Fatehi, P. and Ni, Y., 2014. Thermal Degradation Behavior of Lignin-Based Complexes Derived from Pre-Hydrolysis Liquor of Kraft-Based Dissolving Pulp Process.
- Shanmugam, A., Kathiresan, K. and Nayak, L., 2016. "Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885)." *Biotechnology Reports* 9: 25-30.
- Shafiei Amrehei, S.Sh., Rasooly Garmaroody, E., Djafari Petroudy, S.R. and Ramezani, O., 2018. The effect of bagasse pith xylose on yeast growth kinetic in bio-products manufacture, *Iranian Journal of Wood and Paper Industries*, Vol. 9, No. 1.
- Šimkovic, I., Kelnar, I., Uhliaríková, I., Mendichi, R., Mandalika, A. and Elder, T., 2014. "Carboxymethylated-, hydroxypropylsulfonated- and quaternized xylan derivative films." *Carbohydrate Polymers* 110: 464-471.
- Sukhbaatar, B., Hassan, E.B., Kim, M., Steele, P. and Ingram, L., 2014. Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses.
- Suman, S.P., Mancini, R.A., Joseph, P., Ramanathan, R., Konda, M.K.R., Dady, G. and Yin, S., 2010. "Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef." *Meat Science* 86(4): 994-998.
- Valizadeh, S., Naseri, M., Babaei, S., Hosseini, S.M.H. and Imani, A., 2019. Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid.
- Zhu Ryberg, Y.Z., Edlund, U. and Albertsson, A.C., 2011. (Conceptual Approach to Renewable Barrier Film Design Based on Wood Hydrolysate." *Biomacromolecules* 12(4): 1355-1362.
- and Sun, R.C., 2016. "High Strength Hemicellulose-Based Nanocomposite Film for Food Packaging Applications.
- Guan, Y., Qi, X.M., Chen, G.G., Peng, F. and Sun, R.C., 2016. "Facile approach to prepare drug-loading film from hemicelluloses and chitosan." *Carbohydrate polymers* 153: 542-548.
- Guan, Y., Qi, X.M., Chen, G.G., Peng, F. and Sun, R.C., 2014. "Organic-Inorganic Composite Films Based on Modified Hemicelluloses with Clay Nanoplatelets." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2(7): 1811-1818.
- Hettrich, K., Drechsler, U., Loth, F. and Volkert, B., 2017. "Preparation and Characterization of Water-Soluble Xylan Ethers." *Polymer* 9(4).
- Huang, B., Liu, M., and Zhou, C., 2017. Chitosan Composite Hydrogels Reinforced with Natural Clay Nanotubes.
- Kong, W., D. Huang, G. Xu, J. Ren, C. Liu, L. Zhao and R. Sun (2016). Graphene Oxide/Polyacrylamide/Aluminum Ion Cross-Linked Carboxymethyl Hemicellulose Nanocomposite Hydrogels with Very Tough and Elastic Properties.
- Koosha, M. and Hamedí, S., 2019. "Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties." *Progress in Organic Coatings* 127: 338-347.
- Kumar, S., Deepak, V., Kumari, M. and Dutta, P.K., 2016. "Antibacterial activity of diisocyanate-modified chitosan for biomedical applications." *International Journal of Biological Macromolecules* 84: 349-353.
- Lefnaoui, S. and Moulai-Mostefa, N., 2015. "Synthesis and evaluation of the structural and physicochemical properties of carboxymethyl pregelatinized starch as a pharmaceutical excipient." *Saudi Pharmaceutical Journal* 23(6): 698-711.
- Li, Z., Lin, S., An, S., Liu, L., Hu, Y. and Wan, L., 2019. "Preparation, characterization and anti-aflatoxigenic activity of chitosan packaging films incorporated with turmeric essential oil." *International Journal of Biological Macromolecules* 131: 420-434.
- Peng, X.W., Ren, J.L., Zhong, L.X., Cao, X.-F. and Sun, R.C., 2011. "Microwave-Induced Synthesis of Carboxymethyl Hemicelluloses and Their Rheological Properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(2): 570-576.
- Queirós, L.C.C., Sousa, S.C.L., Duarte, A.F.S., Domingues, F.C. and Ramos, A.M.M., 2017.

Chemical modification of the xylan extracted from bagasse pith for preparation of antibacterial carboxymethyl xylan/chitosan film

P. Yousefi¹, S. Hamedi^{2*}, E. Rasooly Garmaroody³ and M. Koosha³

1-Master of science, Biological Refining Group, Shahid Beheshti University, Faculty of New Technologies Engineering, Zirab Compus, Mazandaran, Savadkooh, Iran

2*-Corresponding author, Assistant Prof., Biological Refining Group, Shahid Beheshti University, Faculty of New Technologies Engineering, Zirab Compus, Mazandaran, Savadkooh, Iran, Email: se.hamedi@sbu.ac.ir

3-Assistant Prof., Biological Refining Group, Shahid Beheshti University, Faculty of New Technologies Engineering, Zirab Compus, Mazandaran, Savadkooh, Iran

Received: Aug., 2019

Accepted: Nov., 2019

Abstract

Bio-refinery includes technologies which can convert biomass resources to valuable products. In this study, carboxymethylation of the xylan-rich hemicelluloses extracted from sugarcane bagasse pith was performed. DS of the carboxymethyl xylan (CMX) was determined at 0.68 using ICP-OES analysis. It was found that, the presence of absorption bands at 1580 and 1311 cm⁻¹ in the FTIR spectrum of the modified xylan are associated to the stretching vibration of C-O bonds of carboxymethyl groups. The carboxymethyl xylan/chitosan (CMX/CS) films were then prepared by casting method. XRD pattern showed that the intensity of the characteristic peaks of the chitosan was reduced after film preparation which may be due to decreasing the crystalline nature of the film. SEM images showed that the surface of the film is uniform. The exothermic peak in DSC thermograms showed that the films degraded at higher than 200°C. Water vapor permeability (WVP) of the carboxymethyl xylan/chitosan film was measured 0.84[±]0.1 g mm/m² h kPa. Colorimetric analysis proved that the white index (WI) of the CMX/CS film increased as compared with xylan/chitosan film. On the contrary, the yellow index (YI) of the CMX/CS film decreased. Swelling ratios of the CMX/CS and xylan/CS films were measured as 130.42 and 95.71 respectively. The prepared CMX/CS films exhibited higher tensile strength compared to xylan/chitosan film. This may be resulted from the interactions between amine groups of chitosan and carboxyl groups of CMX. CMX/CS film exhibited the stronger antibacterial activity against *E. coli* compared to *S. aureus*.

Keywords: Bagasse pith, alkaline extraction of xylan, carboxymethyl xylan, xylan/chitosan film, carboxymethyl xylan/chitosan film, antibacterial activity.